

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 382 381**

51 Int. Cl.:

**A61B 10/00** (2006.01)

**A61B 10/02** (2006.01)

**A61F 13/38** (2006.01)

**B01L 3/00** (2006.01)

**G01N 1/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05717773 .5**

96 Fecha de presentación: **23.02.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1727473**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **06.12.2006**

54 Título: **Sistemas de hisopo y punzón de biopsia para diagnóstico**

30 Prioridad:  
23.02.2004 GB 0403976  
23.02.2004 GB 0403978  
15.07.2004 US 587861 P  
28.01.2005 GB 0501818

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**07.06.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**07.06.2012**

73 Titular/es:  
**ETHICON, INC.**  
**US ROUTE NO. 22**  
**SOMERVILLE, NJ 08876-0151, US**

72 Inventor/es:  
**BAYLIFF, Simon, William;**  
**DEL BONO, Michelle;**  
**BIOTT, Maurice, Charles y**  
**LINDSAY-WATT, Sylvia**

74 Agente/Representante:  
**Carpintero López, Mario**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

ES 2 382 381 T3

## DESCRIPCIÓN

Sistemas de hisopo y punzón de biopsia para diagnóstico.

### **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a dispositivos de ensayo de hisopo y punzón de biopsia para diagnóstico que comprenden capuchones diagnósticos.

### **Antecedentes técnicos de la invención**

Los hisopos absorbentes son generalmente conocidos en las artes médicas para su uso en la recogida de muestras de fluido de un paciente para su posterior análisis. Los hisopos médicos comprenden comúnmente una punta de hisopo fibrosa en un extremo de una varilla o palo alargado que se maneja manualmente para hacer entrar en contacto la punta del hisopo con una parte seleccionada de un paciente, por ejemplo la superficie de una herida. Como resultado, parte del fluido tisular, que incluye material celular, se adhiere a la punta del hisopo que a continuación puede ponerse en contacto con uno o más reactivos seleccionados para indicar la presencia de infección u otra información acerca del estado del paciente. Los ensayos comúnmente realizados con muestras de hisopo incluyen ensayos de fluorescencia, ensayos enzimáticos, ensayos basados en anticuerpos monoclonales y ensayos de aglutinación.

A veces puede lograrse una precisión diagnóstica aún mayor mediante análisis de una muestra de biopsia. Por lo general, la muestra de biopsia puede tomarse por medio de un punzón de biopsia cilíndrico y afilado situado en un extremo de una varilla o palo alargado con el que se realiza una punción manual del tejido de interés. A continuación, la muestra obtenida por punción se homogeniza y analiza con reactivos adecuados para llegar a un diagnóstico.

De acuerdo con las técnicas estándar, la muestra biológica recogida (hisopo o biopsia) se transfiere normalmente de la punta del hisopo o del punzón de biopsia a un portaobjetos u otros dispositivos de laboratorio tales como un tubo de ensayo o similar para que entre en contacto con los reactivos seleccionados y para su posterior análisis. Sin embargo, puede resultar difícil garantizar la transferencia de una cantidad de muestra suficiente de la punta del hisopo al tubo de ensayo o al portaobjetos de laboratorio para garantizar unos resultados precisos del ensayo. Puede producirse accidentalmente la contaminación de la muestra durante la transferencia, y los retrasos entre el momento de la toma de la muestra y la realización real del ensayo también pueden dar como resultado una disminución en la fiabilidad del ensayo. La necesidad de una etapa de análisis aparte también aumenta el costo global del procedimiento diagnóstico.

El documento US-A-5266266 describe un hisopo de diagnóstico que presenta una varilla de hisopo hueca que se extiende entre una punta de hisopo adaptada para recoger una muestra diana y una punta separable que sobresale en un depósito de solución reactiva. Tras la recogida de una muestra en la punta del hisopo, se efectúa la deformación del depósito para separar la punta del hisopo para abrir el extremo posterior de la varilla del hisopo y permitir el flujo del reactivo desde la cámara de reactivo a través de la varilla del hisopo hasta la punta del hisopo. El hisopo está completamente encerrado en un alojamiento que presenta un capuchón, en el que puede proporcionarse un reactivo adicional, tal como perlas tratadas, para la reacción con el eluato de la punta del hisopo. Este sistema de hisopo requiere cantidades bastante grandes de material de moldeado termoplástico para su construcción, y cantidades bastante grandes de solución reactiva para un funcionamiento satisfactorio, que tiene como resultado un aumento del costo y una pérdida de sensibilidad debido a la dilución de la muestra del hisopo.

El documento US-A-6248294 describe una disposición de hisopo de diagnóstico autónomo que comprende un hisopo convencional y un alojamiento de diagnóstico para recibir y encerrar el hisopo después de la recogida de una muestra. El alojamiento de diagnóstico incluye un depósito de reactivo líquido, y una tira de diagnóstico que se extiende hasta un lateral del alojamiento. Este sistema de hisopo de diagnóstico requiere cantidades bastante grandes de material de moldeo termoplástico para su construcción, y una cantidad excesiva de solución reactiva para un funcionamiento satisfactorio.

Los documentos US-B-6524530 y WO-A-2005044110 (que forman parte del estado de la técnica en virtud del artículo 54(3) del EPC) describían adicionalmente unas disposiciones de hisopo de diagnóstico que presentan unos capuchones alargados que contienen reactivos de ensayo para diagnóstico que se ajustan sobre el hisopo para el análisis de las muestras recogidas por el hisopo.

### **Sumario de la invención**

La presente invención proporciona un aparato de ensayo para diagnóstico de acuerdo con la reivindicación 1.

El uso de una varilla que se adapta de esta manera para permitir ajustar un capuchón cerca del primer extremo permite el uso de un capuchón de diagnóstico pequeño con el dispositivo. Esto proporciona una economía en el uso de materiales. Pueden colocarse configuraciones de visualización y medición diagnóstica extremadamente compactas dentro de un capuchón pequeño, minimizando de ese modo el tamaño global del dispositivo, el uso de

reactivos, y la dilución de la muestra, como se hará evidente en el siguiente análisis.

Convenientemente, el capuchón comprende un orificio de recepción de la muestra que presenta una superficie interior adaptada para engancharse a los elementos de enganche del capuchón en la varilla, y un alojamiento que define una trayectoria de flujo lateral para una muestra de líquido, presentando la trayectoria de flujo lateral un extremo de entrada en comunicación fluida con el orificio de recepción de la muestra.

Convenientemente, el dispositivo de ensayo de acuerdo con la invención comprende una primera dicha varilla que presenta un hisopo unido a la misma, y una segunda dicha varilla que presenta un punzón de biopsia unido a la misma, y en el que el capuchón de diagnóstico puede fijarse de manera intercambiable en las dichas varillas primera y segunda.

## **Descripción detallada de la invención**

### *Hisopo/Punzón de Biopsia y Varilla*

El elemento de enganche del capuchón en la varilla para ajustar el capuchón se sitúa a una distancia desde 1 mm hasta aproximadamente 30 mm desde la punta del hisopo o del punzón de biopsia. Esto está en consonancia con el uso de los capuchones de diagnóstico relativamente compactos descritos.

El elemento de enganche del capuchón en la varilla para ajustar el capuchón puede ser una zona de sección decreciente de la varilla para formar un ajuste de interferencia con el capuchón, por ejemplo puede aparecer como un cono truncado que es coaxial con la varilla y que disminuye gradualmente en sección hacia el primer extremo de la varilla. O toda la varilla puede tener un diámetro mayor que el del hisopo o punzón de biopsia, con una zona de sección decreciente adyacente al primer extremo. En cualquier caso, el diámetro de la zona de sección decreciente donde se engancha con el capuchón es mayor que el diámetro del hisopo o punzón de biopsia, de manera que el capuchón puede ajustarse sobre el hisopo o punzón de biopsia.

En otras formas de realización, el elemento de enganche del capuchón puede comprender un saliente de ajuste a presión para formar un ajuste a presión con uno o más salientes complementarios en una superficie interior del capuchón, o un saliente roscado para formar un ajuste de tornillo con una o más roscas complementarias en una superficie interior del capuchón. Resultan especialmente adecuadas las roscas de ajuste rápido tales como las roscas de bayoneta o un cierre Luer para su uso como elementos de enganche en el capuchón y en la varilla.

El hisopo puede ser cualquier hisopo absorbente, por ejemplo un hisopo fibroso no tejido. Por lo general el diámetro del hisopo es aproximadamente desde 2 hasta aproximadamente 5 mm, por ejemplo aproximadamente 3 mm. En determinadas formas de realización, el hisopo puede formarse a partir de una espuma de celdas abiertas médicamente aceptable, por ejemplo una espuma de poliuretano, puesto que tales espumas tienen alta capacidad de absorción y pueden exprimirse fácilmente para expulsar los fluidos absorbidos. El punzón de biopsia será por lo general un punzón cilíndrico de acero inoxidable con un diámetro de aproximadamente 1 mm a aproximadamente 10 mm, por ejemplo aproximadamente 3 mm a aproximadamente 8 mm, convenientemente aproximadamente 6 mm.

En determinadas formas de realización la varilla es hueca, de manera que puede hacerse bajar un fluido por la varilla desde el segundo extremo para expulsar una muestra biológica del hisopo o del punzón de biopsia en el capuchón para el análisis diagnóstico. La varilla puede comprender un adaptador en el segundo extremo para unir una jeringa u otra fuente del fluido. En determinadas formas de realización, el dispositivo puede comprender un depósito de líquido unido al segundo extremo de la varilla, por ejemplo una pera compresible que contiene el líquido, que puede activarse después del uso del hisopo o del punzón de biopsia. Dispositivos adecuados de este tipo se describen, por ejemplo, en el documento US-A-5266266, cuyo contenido completo se incorpora en el presente documento por referencia. En otras formas de realización, el dispositivo puede comprender un émbolo que puede empujarse hacia abajo por el diámetro interior hueco de la varilla para expulsar el fluido u otras muestras del hisopo o del punzón de biopsia.

Otra ventaja de la varilla hueca es que, cuando el dispositivo es un punzón de biopsia, la muestra de biopsia puede empujarse o expulsarse más fácilmente del punzón. El dispositivo de punzón de biopsia puede incluir adicionalmente una herramienta homogeneizadora que puede hacerse bajar por la varilla hueca para homogeneizar una muestra de tejido en el punzón de biopsia. Esta etapa de homogeneización puede seguirse, en caso necesario, de hacer bajar el líquido por la varilla desde el segundo extremo para expulsar el tejido homogeneizado del punzón de biopsia en el capuchón para el análisis diagnóstico.

### *Construcción del capuchón-General*

El capuchón de diagnóstico en el dispositivo de la presente invención comprende, y puede consistir básicamente en, una parte de cuerpo (orificio de recepción de la muestra) generalmente con forma de taza, es decir un tubo corto abierto en un extremo, para recibir el hisopo o el punzón de biopsia.

Convenientemente, la parte de cuerpo de capuchón (orificio de recepción de la muestra) tiene una longitud (medida a lo largo del eje de la varilla cuando el capuchón se fija en el eje) desde aproximadamente 1 cm hasta

aproximadamente 4 cm, por ejemplo desde aproximadamente 15 mm hasta aproximadamente 25 mm. Convenientemente, la parte de cuerpo de capuchón (orificio de recepción de la muestra) tiene un diámetro interno desde aproximadamente 1 mm hasta aproximadamente 10 mm, por ejemplo, desde aproximadamente 2 mm hasta aproximadamente 6 mm. Se deduce que el volumen interno del capuchón (y del orificio de recepción de la muestra) cuando se fija en la varilla es pequeño, convenientemente desde aproximadamente 10 mm<sup>3</sup> hasta aproximadamente 1.000 mm<sup>3</sup>, por ejemplo desde aproximadamente 50 mm<sup>3</sup> hasta aproximadamente 300 mm<sup>3</sup>. Este pequeño volumen permite llevar a cabo ensayos diagnósticos sobre muestras pequeñas, por ejemplo con poca o ninguna dilución de las muestras recogidas por un hisopo o un punzón de biopsia típico.

Una superficie interna del cuerpo de capuchón se proporciona preferentemente con unos elementos de ajuste del capuchón para fijar el capuchón a la varilla. Éstos pueden comprender un saliente de ajuste a presión para formar un ajuste a presión con uno o más salientes complementarios en una superficie exterior de la varilla, o un saliente roscado para formar un ajuste de tornillo con una o más roscas complementarias en una superficie exterior de la varilla. Resultan especialmente adecuados los elementos roscados de ajuste rápido, tales como las roscas de bayoneta o un cierre Luer para su uso como elementos de enganche en el capuchón y en la varilla. Los elementos de ajuste complementarios en el capuchón y en la varilla se adaptan preferentemente para proporcionar estanqueidad prácticamente total a los líquidos entre el capuchón y la varilla. Esto asegura que el escape de la muestra de líquido desde el orificio de recepción de la muestra del capuchón tiene lugar por el paso del líquido a través del capuchón hasta una salida que está aguas abajo de uno o más materiales de ensayo para diagnóstico.

Un saliente de sección decreciente puede extenderse hacia arriba desde la base del cuerpo de capuchón hacia la abertura del capuchón en la que se inserta el hisopo o el punzón de biopsia. En determinadas formas de realización, el saliente de sección decreciente puede tener una superficie afilada, abrasiva o serrada para macerar una muestra de tejido en un punzón de biopsia insertado en el capuchón.

Convenientemente, el capuchón es por lo menos parcialmente transparente. Esto permite observar los indicadores de diagnóstico visibles a través del capuchón sin quitar el capuchón. En algunas formas de realización el capuchón es por lo menos parcialmente transparente a la luz ultravioleta, por ejemplo la luz con una longitud de onda de 300-350 nanómetros. En esta o en otras formas de realización, puede haber aberturas de ventana en el capuchón para permitir la observación de un indicador de diagnóstico dentro del capuchón.

Los capuchones contienen dispositivos de ensayo para diagnóstico compactos que pueden encajar dentro de los capuchones pequeños descritos anteriormente en el presente documento, y que pueden utilizarse para analizar uno o más indicadores de diagnóstico, especialmente en muestras de pequeño volumen.

En determinadas formas de realización los capuchones contienen por lo menos un reactivo de ensayo para diagnóstico proporcionado en, o alrededor de, un tapón absorbente situado dentro del cuerpo de capuchón. Convenientemente, el tapón absorbente tiene un volumen sin comprimir desde aproximadamente 10 hasta aproximadamente 1.000 mm<sup>3</sup>, por ejemplo, desde aproximadamente 50 hasta aproximadamente 300 mm<sup>3</sup>. El tapón absorbente drena de manera eficaz la solución de analito hasta los indicadores de diagnóstico en el cuerpo de capuchón.

Por ejemplo, en algunas formas de realización el por lo menos un reactivo de ensayo para diagnóstico se proporciona en o sobre una tira de diagnóstico anular que se extienda por lo menos parte de la distancia alrededor del interior del cuerpo de capuchón, y preferentemente toda la distancia alrededor del interior del cuerpo de capuchón. La tira (o las tiras) puede(n) segmentarse en una pluralidad de zonas adaptadas para detectar diferentes indicadores de diagnóstico, de manera que estas zonas se separan radialmente alrededor del interior del cuerpo de capuchón. La tira (o las tiras) puede(n) envolverse alrededor de un tapón absorbente situado dentro del cuerpo de capuchón, de manera que el tapón absorbente drena el fluido sometido a ensayo hasta la tira o las tiras. Se ha descubierto que un tapón especialmente adecuado para este tipo de drenaje se proporciona mediante un haz cilíndrico de fibras hidrófilas, tales como fibras de poliéster hidrófilas.

En otras formas de realización el por lo menos un reactivo de ensayo para diagnóstico se proporciona dentro de o sobre una hoja de diagnóstico que se extiende transversalmente por el interior del cuerpo de capuchón. Los bordes de la hoja aparecen entonces como un anillo cuando se ven a través de las paredes laterales del cuerpo de capuchón. Una pila de tales hojas puede formar un tapón dentro del cuerpo de capuchón, y pueden adaptarse las diferentes hojas de la pila para indicar la presencia de diferentes marcadores biológicos. Preferentemente, las hojas están hechas de material absorbente, tal como papel de filtro, para extraer la muestra de fluido del hisopo o del punzón de biopsia.

En las formas de realización anteriores, el propio cuerpo de capuchón de diagnóstico (por ejemplo, el orificio de recepción de la muestra) puede llevar unas marcas separadas axial y/o radialmente correspondientes a las diferentes zonas o capas de material de diagnóstico dentro del capuchón.

En las formas de realización anteriores puede proporcionarse una abertura de ventilación en la base del cuerpo de capuchón. Esto facilita un flujo suave de la muestra biológica del hisopo o del punzón de biopsia al cuerpo de capuchón para realizar los ensayos diagnósticos.

En determinadas formas de realización, el capuchón de diagnóstico consiste básicamente en un componente de cuerpo con forma de taza. Estas formas de realización son especialmente compactas y económicas en cuanto a materiales y uso de las muestras.

#### *Flujo lateral*

- 5 En las formas de realización de un capuchón de diagnóstico de flujo lateral, el capuchón comprende convenientemente un orificio de recepción de la muestra que presenta una superficie interior adaptada para engancharse con los elementos de enganche del capuchón en la varilla, y un alojamiento que define una trayectoria de flujo del fluido para una muestra de líquido, presentando la trayectoria de flujo del fluido un extremo de entrada en comunicación fluida con el orificio de recepción de la muestra.

10 El tamaño, la forma y la configuración del orificio de recepción de la muestra son preferentemente como se ha descrito anteriormente en el presente documento. En algunas formas de realización el alojamiento comprende adicionalmente de manera preferente una base para el capuchón, de manera que el capuchón pueda apoyarse sobre dicha base en una superficie horizontal abriéndose el orificio de recepción de la muestra en una dirección ascendente para recibir la varilla. Preferentemente, el eje del orificio de recepción de la muestra es vertical o casi vertical (por ejemplo, dentro de aproximadamente 30° de la vertical) y en cualquier caso la base y el orificio se configuran de manera que el hisopo o punzón de biopsia pueda permanecer erguido cuando se fija en el orificio de recepción de la muestra. Esto resulta ventajoso ya que permite drenar la muestra fuera del hisopo o punzón de biopsia en el dispositivo de diagnóstico bajo la influencia de la gravedad, simplemente manteniendo erguido el dispositivo en la base del capuchón.

20 Convenientemente, el alojamiento tiene una superficie interior prácticamente plana que forma la base para el alojamiento, y el orificio de recepción de la muestra se abre hacia arriba desde una superficie superior del alojamiento frente a dicha superficie plana inferior. Por ejemplo, la base puede ser una estructura básicamente laminar, proyectándose el orificio de recepción de la muestra hacia arriba desde la misma, preferentemente desde una zona central de la misma para proporcionar la máxima estabilidad cuando la varilla del hisopo se recibe en el orificio de recepción de la muestra.

25 Se deduce que la trayectoria de flujo del fluido se extiende de manera preferente básicamente en un plano que es prácticamente perpendicular al eje del orificio de recepción de la muestra. La expresión "prácticamente perpendicular" indica en general un plano que presenta un eje normal dentro de aproximadamente 30° del eje del orificio de recepción de la muestra. Esto permite que las paredes laterales de la trayectoria de flujo formen por lo menos parte de la base del alojamiento perpendicular al eje del orificio de recepción de la muestra como se ha descrito anteriormente.

30 Por lo general, la trayectoria de flujo del fluido del dispositivo de ensayo será capaz de soportar el flujo lateral de los líquidos acuosos. Se entiende por "flujo lateral", un flujo de líquido en el que uno de los componentes disueltos o dispersos del líquido se transporta lateralmente, preferentemente a velocidades prácticamente iguales, y con flujo relativamente inalterado, a través del portador. Convenientemente, la trayectoria de flujo del fluido contiene uno o más materiales portadores porosos. Los materiales portadores porosos están preferentemente en comunicación fluida a lo largo de prácticamente toda la trayectoria de flujo del fluido para facilitar la transferencia de fluido a lo largo de la trayectoria por capilaridad. Convenientemente, los materiales portadores porosos son hidrófilos, pero preferentemente ellos mismos no absorben agua. Los materiales portadores porosos pueden funcionar como sustratos sólidos para unir los restos reactivos en la zona de reacción y/o los restos detectores en la zona de detección.

35 Materiales adecuados para formar los materiales portadores porosos incluyen cualquier polímero natural o sintético adecuado, que incluye polisacáridos insolubles tales como celulosa, y polímeros sintéticos tales como poliacrilatos, materiales laminares de polietileno poroso de alta densidad, cloruro de polivinilo, acetato de polivinilo, copolímeros de acetato de vinilo y cloruro de vinilo, poliamida, policarbonato, nailon, fibra de vidrio, orlón, poliéster, poliestireno y mezclas y combinaciones de los mismos. Un material adecuado es la membrana de flujo lateral POREX (marca comercial registrada), disponible en Porex Technologies Corp., Fairburn Georgia, Estados Unidos. Convenientemente, el material portador comprende grupos amina, éster o carboxilato pendientes para facilitar la conjugación.

40 El capuchón de diagnóstico puede comprender una zona de reacción en la trayectoria de flujo del fluido que comprende un resto reactivo que reacciona con un analito en el fluido de herida para liberar un resto indicador; y un resto detector situado en una zona de detección aguas abajo de la zona de reacción en la trayectoria de flujo del fluido, en la que el resto detector puede interactuar con el resto indicador para producir un cambio detectable en la zona de detección. El resto reactivo y/o el resto detector pueden unirse por lo menos inicialmente a un material portador sólido adecuado y quedar de ese modo inmovilizados.

45 El tamaño y la forma del portador no son críticos y pueden variar. El portador define una trayectoria de flujo lateral. Convenientemente, el portador poroso está en forma de una o más columnas o tiras alargadas. En determinadas

formas de realización, el portador poroso es una o más tiras alargadas de material laminar, o una pluralidad de hojas que componen en combinación una tira alargada. La zona de reacción y la zona de detección estarían entonces por lo general separadas a lo largo del eje largo de la tira. Sin embargo, en algunas formas de realización el portador poroso puede tener, por ejemplo, hojas con otra forma, tal como un disco. En estos casos la zona de reacción y la zona de detección se dispondrían por lo general concéntricamente alrededor del centro de la hoja, con una zona de aplicación de la muestra en el centro de la hoja. En todavía otras formas de realización, el portador está formado por perlas portadoras, por ejemplo perlas hechas de cualquiera de los materiales descritos anteriormente. Las perlas pueden dimensionarse convenientemente desde aproximadamente 1 micrómetro hasta aproximadamente 1 mm. Las perlas pueden empaquetarse en la trayectoria de flujo dentro del alojamiento, o pueden capturarse o soportarse en un sustrato poroso adecuado como una almohadilla de fibra de vidrio.

Normalmente, la trayectoria de flujo del fluido comprende adicionalmente una zona de aplicación de la muestra aguas arriba de la zona de reacción y en comunicación fluida con el interior del cuerpo de capuchón. El dispositivo se configura de manera que, durante el funcionamiento, la muestra de fluido fluya lateralmente desde la zona de aplicación de la muestra hasta la zona de reacción y a continuación hasta la zona de detección.

Se apreciará que los dispositivos de acuerdo con la presente invención pueden adaptarse para detectar más de un analito. Esto puede hacerse mediante el uso de varios restos reactivos diferentes en una única zona de reacción, o preferentemente proporcionando en un único dispositivo una pluralidad de trayectorias de flujo lateral, presentando cada una un resto reactivo diferente en su zona de reacción respectiva para detectar un analito diferente, por ejemplo, la pluralidad de trayectorias de flujo lateral puede distribuirse radialmente alrededor de un cuerpo de capuchón. En algunas formas de realización, la pluralidad de trayectorias de flujo del fluido está separada físicamente por el alojamiento. En otras formas de realización pueden definirse múltiples trayectorias de flujo lateral (calles) en una única membrana de flujo lateral depositando líneas de cera o material hidrófobo similar entre las calles.

Convenientemente, la pluralidad de trayectorias de flujo lateral se define como trayectorias de flujo del fluido separadas en el alojamiento, y preferentemente la pluralidad de trayectorias de flujo lateral se separa radialmente alrededor del orificio de recepción de la muestra en un plano prácticamente perpendicular al eje del orificio de recepción de la muestra. El alojamiento de la pluralidad de trayectorias de flujo separadas radialmente puede entonces proporcionar una base estable que se extiende radialmente alrededor del orificio de recepción de la muestra.

El alojamiento está hecho normalmente de un material termoplástico, preferentemente por lo menos parte del alojamiento se moldea de una sola pieza con el cuerpo de capuchón. Materiales adecuados incluyen polietileno, polipropileno, poliacrilato, poliamida o poliestireno. Convenientemente, el alojamiento se hace encajando entre sí dos componentes de plástico que forman la parte superior e inferior del alojamiento, respectivamente. Procedimientos adecuados para la fabricación de los componentes del alojamiento incluyen el moldeo por inyección y la estereolitografía. Convenientemente, el alojamiento es por lo menos parcialmente transparente. Esto permite observar los indicadores de diagnóstico visibles a través del alojamiento. En algunas formas de realización el alojamiento es por lo menos parcialmente transparente a la luz ultravioleta, por ejemplo luz con una longitud de onda de 300-350 nanómetros. En algunas formas de realización, el alojamiento comprende una ventana para observar la zona de detección.

En todas las formas de realización anteriormente indicadas, cuando se fija el capuchón en la varilla, el hisopo o la biopsia están preferentemente en contacto con un material absorbente que puede drenar el fluido fuera del hisopo o de la biopsia a los uno o más reactivos de diagnóstico. Esto minimiza la necesidad de un líquido diluyente para eliminar por lavado la muestra del hisopo o de la biopsia en el material de diagnóstico, según lo requerido en la técnica anterior descrita anteriormente en el presente documento. En determinadas formas de realización, el capuchón de diagnóstico se conforma y se configura para comprimir el hisopo cuando el capuchón se fija a la varilla, para de ese modo exprimir la muestra de líquido fuera del hisopo y en los materiales de diagnóstico. Esta forma de realización resulta especialmente adecuada cuando el hisopo comprende un material de espuma de celdas abiertas.

Convenientemente, el capuchón puede proporcionarse con un filtro que se sitúa entre el hisopo o el punzón de biopsia y el material de diagnóstico cuando el capuchón se fija en la varilla durante el funcionamiento. El filtro puede ser cualquier papel o película microporosa adecuada para la separación de residuos sólidos de la solución de analito a pasar al material de diagnóstico.

Convenientemente, el capuchón puede proporcionarse con un indicador de llenado. Es decir, un medio para indicar cuándo todo el material o todos los materiales de diagnóstico han sido humedecidos por la solución de analito. Por ejemplo, el indicador de llenado puede ser una hoja de papel de filtro en la base del capuchón, o en el extremo distal de una trayectoria de flujo lateral, que ha sido tratado para cambiar de color cuando es humedecido por la solución de analito.

#### *Química diagnóstica*

Por lo menos una parte del material de diagnóstico en el capuchón experimenta preferentemente un cambio de color

(la expresión "cambio de color" incluye quimioluminiscencia y/o un cambio de apariencia bajo luz UV) en presencia de uno o más analitos, y preferentemente este cambio de color es visible a través de la pared lateral del capuchón.

Los analitos que pueden ser detectados por los capuchones de diagnóstico de acuerdo con la presente invención incluyen, pero no se limitan a, el grupo seleccionado de pH, potencial redox, actividad de radicales libres, oxígeno activado,  $\text{Fe}^{3+}$ ; enzimas proteasa tales como las que se analizan en mayor detalle más adelante; otras enzimas tales como lisozima, hidrolasas ácidas, lactato deshidrogenasa, glicosidasas, catepsinas B, L, D, G, plasmina, y activador del plasminógeno; indicadores de infecciones de herida tales como lipopolisacáridos, en particular la proteína fosfolipasa A, o proteínas de membrana externa, tales como OMP T; inhibidores de la proteasa tales como TIMPs, PAIs, alfa 1 antitripsina, macroglobulina; citocinas tales como TNF-alfa; interleucinas tales como IL-1, IL-6, IL-10; factores de crecimiento que incluyen GM-CSF, VEGF, PDGF, TGF-beta, IGF; receptores solubles del factor de crecimiento; antagonistas de citocinas; receptor soluble de VEGF; antagonista del receptor IL-1; componentes de matriz o fragmentos de los mismos, tales como glucosaminoglicanos que incluyen ácido hialurónico, péptidos de colágeno, fragmentos de fibronectina, fragmentos de fibrina (o fibrinógeno); receptores de superficie celular (especialmente para biopsia de tejidos), tales como CD44, integrinas, receptor del PDGF, receptores del plasminógeno/u-PA; y moléculas quimioatrayente incluyen leucotrieno B<sub>4</sub>, C<sub>5</sub>A y péptidos formilados.

El analito puede ser una enzima. Por ejemplo, la enzima puede seleccionarse del grupo que consiste en enzimas derivadas de huésped mamífero y enzimas microbianas. La expresión "enzima derivada de huésped mamífero" se refiere a una enzima endógena que se encuentra en el fluido de heridas de mamífero. La expresión "enzimas microbianas" incluye enzimas proteasa que han sido secretadas por microorganismos, o expresadas en la superficie celular de microorganismos tales como bacterias u hongos. La enzima puede ser una enzima proteasa. La expresión "enzima proteasa" se refiere a una enzima que escinde específicamente o no específicamente un péptido, un polipéptido o una proteína.

Las enzimas proteasa endógenas (es decir, derivadas de un huésped) que pueden detectarse mediante los dispositivos y sistemas de la presente invención se seleccionan adecuadamente del grupo que consiste en metaloproteinasas de matriz (MMPs), elastasa, estromalisina, calicreína y trombina. Convenientemente, la proteasa endógena se selecciona del grupo que consiste en proteasas de neutrófilos y proteasas de macrófagos. Las enzimas proteasa preferentes incluyen collagenasas (por ejemplo, MMP-1 y MMP-8), gelatinasas (por ejemplo, MMP-9) y elastasa de neutrófilo, MMP-2, MMP-12, proteinasa 3, plasmina, gelatinasas de bajo peso molecular y elastasas latentes o activas, enzimas convertidoras de interleucina y enzimas convertidoras del factor de necrosis tumoral (TNFα).

Ejemplos de bacterias patógenas que pueden ser detectables mediante la presente invención incluyen, pero no se limitan al género *Staphylococcus* (por ejemplo, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, o *Staphylococcus saprophyticus*), *Streptococcus* (por ejemplo, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae* o *Streptococcus agalactiae*), *Enterococcus* (por ejemplo, *Enterococcus faecalis* o *Enterococcus faecium*), especies de *Corynebacterium* (por ejemplo, *Corynebacterium diphtheriae*), *Bacillus* (por ejemplo, *Bacillus anthracis*), *Listeria* (por ejemplo, *Listeria monocytogenes*), especies de *Clostridium* (por ejemplo, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetanus*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium difficile*), especies de *Neisseria* (por ejemplo, *Neisseria meningitidis* o *Neisseria gonorrhoeae*), *E. coli*, especies de *Shigella*, especies de *Salmonella*, especies de *Yersinia* (por ejemplo, *Yersinia pestis*, *Yersinia pseudotuberculosis*, o *Yersinia enterocolitica*), *Vibrio cholerae*, especies de *Campylobacter* (por ejemplo, *Campylobacter jejuni* o *Campylobacter fetus*), *Helicobacter pylori*, *Pseudomonas* (por ejemplo, *Pseudomonas aeruginosa* o *Pseudomonas mallei*), *Peptostreptococcus* (por ejemplo *Peptostreptococcus magnus*), *Bacteroides fragilis*, *Haemophilus influenzae*, *Bordetella pertussis*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Ureaplasma urealyticum*, *Legionella pneumophila*, *Treponema pallidum*, *Leptospira interrogans*, *Borrelia burgdorferi*, micobacterias (por ejemplo, *Mycobacterium tuberculosis*), *Mycobacterium leprae*, especies de *Actinomyces*, especies de *Nocardia*, *Chlamydia* (por ejemplo, *Chlamydia psittaci*, *Chlamydia trachomatis* o *Chlamydia pneumoniae*), *Rickettsia* (por ejemplo, *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia prowazekii* o *Rickettsia akari*), *Brucella* (por ejemplo, *Brucella abortus*, *Brucella melitensis* o *Brucella suis*), *Proteus mirabilis*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter cloacae*, *Acetivobacter anitratus*, *Klebsiella pneumoniae* y *Francisella tularensis*.

En determinadas formas de realización, el analito enzimático microbiano comprende una proteasa bacteriana seleccionada del grupo que consiste en enzimas bacterianas de *Pseudomonas Aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia Coli*, *Streptococcus Pyogenes* y *Staphylococcus Aureus*. Las enzimas son específicas de especie y en algunos casos no se conoce el marcador enzimático real que se está detectando.

En formas de realización adecuadas, el material de diagnóstico en el dispositivo de la presente invención comprende un indicador de pH o un indicador redox. Un pH bajo y un estrés oxidativo alto son características de la heridas infectadas o crónicas. Los indicadores de pH cromogénicos unidos a sustratos sólidos, tales como papeles indicadores universales, son conocidos en la técnica. Los indicadores redox incluyen sustancias que experimentan un cambio de color en presencia de especies reactivas del oxígeno tales como radicales superóxido o hidroxilo. Una de tales moléculas indicadoras es el difenilpicrilhidracilo, que experimenta un cambio de color de púrpura a incoloro en presencia de radicales libres.

En formas de realización adecuadas, el material de diagnóstico en el dispositivo de la presente invención contiene

una o más parejas de unión inmunológica para unirse a la una o más moléculas de analito presentes en la muestra. Las parejas de unión inmunológica pueden comprender, por ejemplo, anticuerpos monoclonales o policlonales, fragmentos de anticuerpos, o anticuerpos quiméricos. De manera alternativa, las parejas de unión inmunológica pueden comprender antígenos en los casos en que se está mapeando la presencia de anticuerpos predeterminados en la muestra. Preferentemente, las parejas de unión inmunológica comprenden anticuerpos monoclonales. Preferentemente, las parejas de unión inmunológica u otras parejas de unión se inmovilizan en un material portador sólido, por ejemplo, mediante engarce de avidina-biotina o derivatización con dialdehído del material de soporte (portador), seguido de entrecruzamiento con una pareja de unión peptídica. Otros reactivos y/o parejas de unión inmunológica o moléculas indicadoras pueden estar presentes en la solución opcionalmente utilizada para expulsar la muestra del hisopo o del punzón de biopsia como se ha descrito anteriormente en el presente documento.

Las parejas de unión inmunológica u otras parejas de unión de los materiales sólidos de soporte pueden utilizarse en una amplia variedad de inmunoensayos para mapear la presencia de moléculas biológicamente activas. Por ejemplo, el soporte que presenta anticuerpos o fragmentos de anticuerpos unidos al mismo puede utilizarse en el mapeo por inmunoensayo tipo sándwich. De manera alternativa, el soporte puede tener ligandos análogos unidos a los anticuerpos, de manera que las moléculas presentes en el fluido de herida se detectan mediante inmunoensayo de desplazamiento por afinidad. Otros diversos inmunoensayos se pondrán de manifiesto para las personas expertas en la materia.

Dispositivos de inmunoensayo de flujo lateral se describen, por ejemplo, en el documento WO95/04280.

Como ya se ha señalado, los analitos de interés pueden incluir enzimas que pueden modificar sustratos, por ejemplo proteínas o polipéptidos, por escisión. Puede detectarse tal modificación de los sustratos peptídicos para determinar la presencia o ausencia del analito en una muestra. Por consiguiente, en formas de realización adecuadas, el material de diagnóstico en el dispositivo de la presente invención comprende un sustrato quimioluminiscente, cromogénico o fluorogénico para un analito enzimático presente en la muestra.

Un procedimiento para detectar la modificación de un sustrato por una enzima es marcar el sustrato con dos colorantes diferentes, donde un colorante sirve para inactivar la fluorescencia del otro colorante por transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) cuando las moléculas de colorante están muy cercanas. Un par donante y aceptor típico para la transferencia de energía por resonancia consiste en ácido 4-[[[dimetilamino]fenil]azo] benzoico (DABCYL) y ácido 5-[(2-aminoetilamino) naftaleno sulfónico (EDANS). EDANS se excita por iluminación con luz de 336 nanómetros, y emite un fotón con una longitud de onda de 490 nm. Si un resto DABCYL se sitúa dentro de los 2 nanómetros del EDANS, este fotón será absorbido eficazmente. DABCYL y EDANS pueden unirse a los extremos opuestos de un péptido en el material de diagnóstico utilizado en los sistemas de la presente invención. Si el péptido está intacto, FRET será muy eficaz. Si el péptido ha sido escindido por un analito enzimático, los dos colorantes ya no estarán muy cercanos y FRET será ineficaz. La reacción de escisión puede seguirse observando una disminución de la fluorescencia DABCYL o un incremento en la fluorescencia EDANS (pérdida de la inactivación).

Otro material de diagnóstico adecuado comprende un colorante cromogénico conjugado con un soporte sólido mediante un resto de sustrato escindible adecuado, tal como un péptido. El colorante cromogénico cambiará de color cuando el grupo de engarce sea escindido por el analito de interés. Por ejemplo, el para-nitrofenil es incoloro cuando se engarza al soporte, y se vuelve amarillo cuando se escinde. La concentración de analito puede determinarse midiendo la absorbancia a 415 nanómetros. Los expertos en la materia conocen otros colorantes que producen cambios de color detectables tras la escisión.

En todavía otra forma de realización, el material de diagnóstico puede comprender un soporte coloreado que tiene una molécula coloreada de manera diferente conjugada con mismo mediante un resto de engarce que puede escindirse mediante un analito, por ejemplo una enzima en la muestra. De ese modo, la escisión del colorante del soporte coloreado puede tener como resultado un cambio de color del material de diagnóstico.

El material de soporte sólido utilizado para los inmunoensayos y los ensayos de actividad enzimática anteriormente identificados pueden comprender cualquier material sólido tal como se ha analizado anteriormente. Los entrecruzamientos escindibles, cuando están presentes, comprenden generalmente secuencias oligopeptídicas escindibles u oligosacáridos escindibles, cada uno por lo general de veinte residuos o menos, por ejemplo de 3 a 15 residuos.

La sensibilidad del material de diagnóstico dependerá de una serie de factores, que incluyen la longitud de las secuencias de engarce escindibles. También puede reducirse el impedimento estérico por acoplamiento de la secuencia oligopeptídica escindible al polímero por medio de un espaciador apropiado. De esta manera, las secuencias oligopeptídicas pueden acoplar los polímeros directamente (en cuyo caso el entrecruzamiento consiste en la secuencia oligopeptídica) o por medio de un espaciador apropiado. En el documento US-A-5770229 se describen procedimientos de conjugación adecuados que incorporan espaciadores.

El siguiente documento proporciona una revisión útil de las técnicas de bioconjugación para su uso en química farmacéutica: Veronese, F.M. y Morpurgo, M (1999) Bioconjugation in Pharmaceutical chemistry II Farmaco, 54,



497-516 y Ulbrich, K., *et al.* (2000) Journal of controlled release 64, 63-79.

La presente invención resulta especialmente adecuada para la detección de una amplia variedad de enzimas en muestras biológicas. Por lo general, la enzima se selecciona de manera que los niveles elevados de la enzima en un fluido de herida se asocien al dolor, a la infección de la herida o a la cronicidad de la herida. Por lo general, la enzima es una proteasa, y el grupo de engarce comprende una secuencia oligopeptídica que es un sustrato para la proteasa.

En determinadas formas de realización, las proteasas a detectar pueden incluir elastasa. Los niveles de elastasa se encuentran elevados en una variedad de trastornos de la curación de heridas, que incluyen heridas infectadas y heridas crónicas. En tales formas de realización, engarces de sustrato adecuados pueden incluir una o más de las secuencias oligopeptídicas Lys-gly-ala-ala-lys-Ala-Ala-Ala-, Ala-Ala-Pro-Val, Ala-Ala-Pro-Leu, Ala-Ala-Pro-Phe, Ala-Ala-Pro-Ala o Ala-Tyr-Leu-Val.

En determinadas formas de realización, las proteasas a detectar pueden incluir una metaloproteinasa de matriz, en concreto MMP-2 o MMP-9. Estas metaloproteinasas de matriz se encuentran elevadas en las heridas crónicas tales como úlceras venosas, úlceras diabéticas y úlceras por presión. En estas formas de realización, el engarce escindible puede comprender la secuencia oligopeptídica -Gly-Pro-Y-Gly-Pro-Z-, -Gly-Pro-Leu-Gly-Pro-Z-, -Gly-Pro-Ile-Gly-Pro-Z-, o -Ala-Pro-Gly-Leu-Z-, donde Y y Z son aminoácidos.

En determinadas formas de realización, las proteasas a detectar pueden incluir una collagenasa. La collagenasa se encuentra elevada en las heridas crónicas tales como úlceras venosas, úlceras diabéticas y úlceras por presión. En estas formas de realización, el engarce escindible puede comprender la secuencia oligopeptídica -Pro-Leu-Gly-Pro-D-Arg-Z-, -Pro-Leu-Gly-Leu-Leu-Gly-Z-, -Pro-Gln-Gly-Ile-Ala-Gly-Trp-, -Pro-Leu-Gly-Cys(Me)-His-, -Pro-Leu-Gly-Leu-Trp-Ala-, -Pro-Leu-Ala-Leu-Trp-Ala-Arg-, o -Pro-Leu-Ala-Tyr-Trp-Ala-Arg-, donde Z es un aminoácido.

En determinadas formas de realización, las proteasas a detectar pueden incluir una gelatinasa. La gelatinasa se encuentra elevada en las heridas crónicas tales como úlceras venosas, úlceras diabéticas y úlceras por presión. En estas formas de realización, el engarce escindible puede incluir la secuencia oligopeptídica -Pro-Leu-Gly-Met-Trp-Ser-Arg-.

En determinadas formas de realización, las proteasas a detectar pueden incluir trombina. En estas formas de realización, el engarce escindible puede comprender la secuencia oligopeptídica -Gly-Arg-Gly-Asp-, -Gly-Gly-Arg-, -Gly-Arg-Gly-Asp-Asn-Pro-, -Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-, -Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro-Lys-, -Gly-Pro-Arg-, -Val-Pro-Arg-, o -Phe-Val-Arg-.

En determinadas formas de realización, las proteasas a detectar pueden incluir estromalisina. En estas formas de realización, el engarce escindible puede comprender la secuencia oligopeptídica -Pro-Tyr-Ala-Tyr-Trp-Met-Arg-.

En determinadas formas de realización, las proteasas a detectar pueden incluir una calicreína. La expresión "una calicreína" se refiere a todas las serín proteasas cuya activación se asocia con la degradación de cininógeno para formar cininas, que están implicadas en la aparición del dolor. Secuencias adecuadas de péptidos para su uso en un sustrato escindible para la calicreína incluyen -Phe-Arg-Ser-Ser-Arg-Gln o -Met-Ile-Ser-Leu-Met-Lys-Arg-Pro-Glu- que pueden ser degradadas por la calicreína en los enlaces Lys-Arg o Arg-Ser.

Además de las proteasas, también se prevé que la enzima pueda ser, por ejemplo, una quitinasa o quitosanasa antibacteriana tal como lisozima (elevada en heridas infectadas), en cuyo caso el sustrato para la enzima sería un polisacárido u oligosacárido que comprende residuos de D-glucosamina o N-acetil D-glucosamina.

Los engarces peptídicos para la detección de enzimas proteasa microbianas específicas se determinan utilizando una variedad de técnicas que incluyen las referencias de la literatura al sustrato natural de la enzima y el cribado empírico. Los procedimientos de identificación de enzimas bacterianas y sustratos peptídicos a este efecto se describen en los documentos WO03/063693, US-A-2003/0096315 y WO2004/047614. Engarces peptídicos adecuados incluyen los siguientes:

Secuencia 1: ETKVEENEAIQK

Secuencia 2: VTLENTALRC

Secuencia 3: QADALHDQASALKC

Secuencia 4: KVSRRRRRGDKVDRRRRRGGD

Las Secuencias 1 y 2 anteriormente indicadas son específicas para *Staphylococcus*, la Secuencia 3 es específica para *Pseudomonas*, la Secuencia 4 es específica para *E. coli*.

En algunas formas de realización, el péptido es una secuencia que tiene por lo menos un 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95% o 99% de identidad de secuencia con una de las secuencias enumeradas en el presente documento, según se determina utilizando un programa de comparación de secuencias y los parámetros descritos

en el presente documento.

En las formas de realización de flujo lateral, el resto indicador puede comprender una enzima indicadora, y entonces la zona de detección contiene preferentemente un reactivo que experimenta un cambio visible en presencia de la enzima indicadora. Por ejemplo, la enzima indicadora puede ser una enzima redox. Enzimas indicadoras adecuadas incluyen lacasa (CotA), proteína verde fluorescente (GFP), luciferasa, fosfatasa alcalina (ALP), p-galactosidasa, acetilcolinesterasas, y en concreto, peroxidasa de rábano (HRP).

El resto detector en la zona de detección experimenta preferentemente un cambio de color (la expresión "cambio de color" incluye quimioluminiscencia y/o un cambio en la apariencia bajo luz UV) en presencia de uno o más de los restos indicadores, y preferentemente este cambio de color es visible a través de la ventana o pared lateral del alojamiento. En estas y otras formas de realización de la invención, el cambio de color puede evaluarse visualmente (por ejemplo, por comparación con una clave de color) o mediante dispositivos de detección óptica, tales como analizadores de reflectancia, analizadores de imágenes de vídeo y similares. De esta manera, pueden determinarse los niveles de analito diana mediante los dispositivos de la presente invención.

Convenientemente, el resto indicador es una enzima redox, y, entonces, en estas formas de realización el reactivo en la zona de detección puede ser un indicador redox. Por ejemplo, cuando el resto indicador es HRP, el resto indicador puede comprender 4-cloro-1-naftol, que experimenta un cambio de color de incoloro a azul en presencia de HRP y peróxido de hidrógeno. También es posible que puedan utilizarse otros sustratos HRP. Estos incluirán TBM (3,3,5,5-tetrametilbencidina), DAB (3,3- diaminobencidina), DAB potenciada con metales tales como cobalto y níquel, AEC (3-amino-9 etilcarbazol), o una combinación de estos sustratos.

Cuando el resto indicador comprende fosfatasa alcalina, entonces el resto detector puede comprender BCIP/NBT o p-nitrofenilfosfato. Cuando el resto indicador comprende CotA, el resto detector puede comprender naftol, que cambia de incoloro a azul oscuro en presencia de CotA. Cuando el resto indicador comprende luciferasa, el resto detector puede comprender luciferina, que experimenta una reacción de quimioluminiscencia con la luciferasa.

Se comprenderá que el uso de los dispositivos de acuerdo con la presente invención puede implicar etapas de reacción adicionales para detectar los analitos deseados. Por ejemplo, puede quitarse el capuchón de la varilla y tratarse con reactivos adicionales, o puede tratarse el capuchón con uno o más reactivos *in situ* en la varilla haciendo pasar los reactivos a través de la varilla hueca.

En todos los aspectos de la invención, la(s) varilla(s) con el hisopo o el punzón de biopsia unido puede(n) esterilizarse, y puede(n) envasarse en un recipiente impermeable a los microorganismos. Los capuchones de diagnóstico también pueden esterilizarse, pero preferentemente no se hace, porque los capuchones no entran en contacto con el paciente diagnosticado. Es una ventaja importante de la invención que los capuchones de diagnóstico no necesiten ser esterilizados de la misma manera como el hisopo/punzón de biopsia. Esta característica amplía considerablemente la variedad de química diagnóstica disponible, puesto que una serie de ensayos químicos, tales como ensayos basados en anticuerpos, pueden ser degradados por las condiciones utilizadas para esterilizar el material médico.

A continuación se describirán adicionalmente formas de realización específicas de la presente invención, a manera de ejemplo, con respecto a los dibujos adjuntos, en los que:

#### **Breve descripción de los dibujos**

La Figura 1 muestra un dispositivo de acuerdo con la presente invención que comprende un hisopo, dos capuchones de diagnóstico, y una jeringa para introducir fluido en la varilla del hisopo;

La Figura 2 muestra la forma de realización de la Figura 1 en sección transversal longitudinal, con un capuchón de diagnóstico y la jeringa fijada en la varilla del hisopo;

La Figura 3 muestra una sección transversal longitudinal a través de una forma de realización alternativa que comprende un punzón de biopsia;

La Figura 4 muestra una sección transversal longitudinal a través de una forma de realización del capuchón de diagnóstico para su uso en el dispositivo de la invención;

La Figura 5 es una vista en perspectiva de un segundo capuchón de diagnóstico y un sistema de hisopo de acuerdo con la presente invención;

La Figura 6 es una sección transversal longitudinal a través de un sistema de capuchón y punzón biopsia de acuerdo con la presente invención antes de la inserción de un punzón de biopsia en el orificio de recepción de la muestra del capuchón;

La Figura 7 es una sección transversal longitudinal a través del sistema de la Fig. 6 después de la inserción del punzón de biopsia en el orificio de recepción de la muestra del capuchón, y durante el análisis utilizando el dispositivo;

La Figura 8 es una vista en sección transversal longitudinal más detallada a través del capuchón de diagnóstico de la Fig. 5;

La Figura 9 es una vista en planta inferior del capuchón de diagnóstico de la Fig. 5;

5 La Figura 10 es una vista en planta inferior del capuchón de diagnóstico de la Fig. 5 habiéndose retirado la parte inferior del alojamiento; y

La Figura 11 es una sección transversal parcial esquemática a través de una de las trayectorias de flujo del fluido en un segundo capuchón de diagnóstico de flujo lateral de acuerdo con la presente invención, similar al de la Fig. 5, que muestra las diferentes zonas de la trayectoria de flujo del fluido.

### **Descripción de las formas de realización preferentes**

10 En relación a las Figuras 1 y 2, el dispositivo comprende una varilla hueca 1, que generalmente se moldea de una sola pieza a partir de un polímero termoplástico. Se fija un hisopo convencional 2 de fibras no tejidas o esponja médicamente aceptable a un primer extremo de la varilla 1, en comunicación fluida con el interior hueco de la varilla 1.

15 El dispositivo comprende adicionalmente dos capuchones de diagnóstico alternativos 3, 4. Cada uno de los capuchones 3, 4 puede formar un buen ajuste de interferencia con una zona ampliada 6 de la varilla del hisopo. La zona ampliada 6 tiene una sección transversal frustocónica que es complementaria a la sección transversal interna de las aberturas de los capuchones 3, 4. En concreto, puede verse que la zona de saliente 6 se extiende radialmente hacia el exterior del hisopo 2. Como resultado, pueden utilizarse capuchones 3, 4 bastante pequeños en el dispositivo de acuerdo con la presente invención.

20 En la parte superior de la varilla hueca 1 hay una abertura 7 que puede formar un ajuste de interferencia estanco a los líquidos con la boquilla 8 de la jeringa 5. La jeringa 5 puede llenarse con gas, y utilizarse simplemente para soplar una muestra de líquido fuera del hisopo 2 en el capuchón de diagnóstico 3, 4. De manera alternativa, la jeringa 5 puede contener agua, solución salina o solución salina tamponada para eliminar por lavado la muestra fuera del hisopo 2 en el capuchón 3, 4. En todavía otra forma de realización, la jeringa 5 puede contener un reactivo de diagnóstico en solución acuosa. En todavía otras formas de realización, el dispositivo puede comprender una pluralidad de jeringas 5 que contienen diferentes soluciones acuosas, por ejemplo diferentes reactivos acuosos para llevar a cabo los análisis deseados en el capuchón. Se comprenderá que las jeringas 5 no necesitan ser estériles, puesto que no se aplican al paciente.

30 En relación a la Figura 3, la estructura de la forma de realización alternativa es prácticamente idéntica a la forma de realización mostrada en las Figuras 1 y 2, salvo que el hisopo 2 ha sido sustituido por un punzón de biopsia de acero inoxidable 9. Durante el funcionamiento, puede hacerse bajar un homogeneizador (no mostrado) por el diámetro interior 10 de la varilla 11 para homogeneizar la muestra del punzón de biopsia antes o después de unir el capuchón de diagnóstico 12.

35 A continuación se describirá en mayor detalle la estructura del capuchón de diagnóstico 3. El capuchón de diagnóstico 3 se forma mediante moldeo por inyección a partir de un polímero transparente, tal como tereftalato de polietileno (PET), polimetacrilato (PMMA), o un policloruro de vinilo (PVC) transparente. En determinadas formas de realización preferentes el capuchón es transparente tanto a la radiación UV y de 300-350 nanómetros como a la radiación visible. Esto puede lograrse, por ejemplo, con algunos plásticos de PVC transparente. El capuchón 3 tiene una abertura 13 en la parte superior que se conforma para formar un ajuste de interferencia estanco a los líquidos en el saliente 6 de la varilla de hisopo 1. En el fondo del capuchón 3 se proporciona una pequeña abertura de salida de gas 14 para facilitar el flujo de la muestra del hisopo 2 en el capuchón 3. La parte inferior del capuchón 3 está ocupada por una pila de discos permeables al líquido 15, 16, 17. Estos discos incluyen una capa de filtración 15 para eliminar los residuos sólidos y celulares de la muestra, las capas de diagnóstico 16 cada una de las cuales experimenta un cambio de color en presencia de un analito predeterminado diferente, y una capa de indicador de llenado 17, que experimenta un cambio de color cuando se humedece. La cantidad total de líquido necesario para humedecer todas las capas de diagnóstico 16 y la capa de indicador 17 es de sólo aproximadamente 100 microlitros, de manera que se necesita poca o ninguna dilución de la muestra recogida en el hisopo para llevar a cabo los análisis diagnósticos para múltiples analitos. Además, puede verse en las Figuras 2 y 3 que, durante el funcionamiento, el hisopo de diagnóstico entra en contacto con las capas de diagnóstico absorbentes en el capuchón 3, de manera que una muestra de líquido en el hisopo puede drenarse directamente en esas capas.

55 El capuchón de diagnóstico 4 comprende un cuerpo de capuchón transparente similar al del capuchón 3. Sin embargo, en lugar de una pila de discos detectores 16 como se muestra en el capuchón 3, el capuchón 4 tiene una tira de diagnóstico anular 20 insertada en la parte inferior del mismo. La tira anular 20 comprende una pluralidad de tiras separadas radialmente 22, 23, sensibles a diferentes analitos de la muestra. Los cambios de color en estas tiras 22, 23 pueden leerse a través de los laterales transparentes del capuchón. Se inserta un tapón 21 dentro de la tira de diagnóstico anular 20 para drenar la muestra de fluido del hisopo a la tira de diagnóstico 20. El tapón 21 está compuesto por un haz de filamentos hidrófilos de poliéster alineados de manera básicamente coaxial con el capuchón. Este haz también sirve para filtrar sólidos y residuos celulares de la muestra antes de que alcance la tira

de diagnóstico 20. Las ventajas de este sistema son similares a las del capuchón 3, pero se necesitan incluso menos de los relativamente caros reactivos de diagnóstico para formar la tira 20. También es posible fabricar un capuchón incluso más compacto adecuado para muestras de fluido incluso más pequeñas proporcionando el tapón 21 con una cavidad cilíndrica en el centro del mismo en la que puede insertarse el hisopo 2.

- 5 En relación a las Figs. 5 a 8, el sistema de ensayo comprende un capuchón de detección de flujo lateral 30, una varilla 32 para punzón de biopsia 44 y una jeringa 34. El capuchón de detección 30 tiene generalmente forma de disco, con un orificio de recepción de la muestra tubular 38 que se proyecta hacia arriba desde el centro del disco en una formación generalmente cilíndrica. La varilla 32, el punzón de biopsia 44 y la jeringa 34 tienen generalmente una estructura similar a la de la forma de realización de la Fig. 1, salvo que las formas de realización de las Figs. 5 a 8 comprenden unas roscas "Luer-Lock" complementarias 42, 46 en la zona ampliada de la varilla y en la superficie interior del orificio de recepción de la muestra.

10 El orificio de recepción de la muestra en las formas de realización mostradas en las Figs. 6 y 7 se proporciona con un saliente cónico 18 que se proyecta hacia arriba desde la base del orificio. Durante el funcionamiento, el saliente cónico 48 aplasta la muestra de biopsia en el punzón 44 para liberar el líquido de la muestra en el tapón cuando el punzón se fija sobre el capuchón, como se muestra en Fig. 7.

15 En relación a las Figs. 8 a 10, el capuchón de diagnóstico 30 comprende un alojamiento formado a partir de una parte superior 50 y una parte inferior básicamente con forma de disco 52. Cada parte puede hacerse mediante moldeo por inyección de material termoplástico. La propia parte superior del alojamiento se hace a partir de dos piezas separadas. Las partes superior e inferior del alojamiento se encajan entre sí por medio de ajustes a presión 54. La superficie inferior de la parte superior del alojamiento 50 comprende cinco cavidades superficiales separadas radialmente 59 para recibir unas tiras reactivas respectivas 64 de materiales portadores porosos, como se muestra en la Fig. 10. Cada tira reactiva se adapta para someter a ensayo un analito diferente, por ejemplo, analitos característicos de una patología de herida diferente. Las tiras reactivas 64 son retenidas en las cavidades por la parte inferior del alojamiento 52. Las trayectorias de flujo del fluido para las muestras se extienden entre las partes superior e inferior del alojamiento a lo largo de las cavidades 59 cuando la parte inferior del alojamiento 52 y la parte superior del alojamiento 50 se ajustan por presión entre sí.

20 Como ya se ha señalado, la parte superior del alojamiento 50 comprende un orificio tubular de recepción de la muestra que se proyecta hacia arriba 38 para recibir el hisopo. Puede situarse un filtro de membrana en el fondo del orificio de entrada en la zona 60 para eliminar partículas y células de la muestra, pero en esta forma de realización se omite la membrana para permitir el paso libre a los analitos enzimáticos de superficie celular. A continuación, la muestra fluye a través de un canal de entrada cilíndrico (anular) 62 hasta los extremos aguas arriba de las cinco tiras reactivas 64.

25 La parte inferior del alojamiento 52 comprende unas aberturas para ver las tiras reactivas. Para cada una de las tiras reactivas dispuestas radialmente hay una ventana de detección 56 por encima de la zona de detección de la tira, y una ventana de control 58 por encima de la zona indicadora de fin de ensayo de la tira reactiva. La superficie inferior de la segunda parte del alojamiento puede proporcionarse adicionalmente con grabado en relieve u otras marcas que identifiquen el analito específico detectado en esa tira. Se comprenderá que las ventanas 56, 58 y de manera alternativa pueden proporcionarse marcas opcionales en la parte superior del alojamiento 50 si resulta preferente la visualización desde la parte superior del dispositivo.

30 En relación a la Figura 11, se muestra una sección transversal ampliada esquemática perpendicular a una de las trayectorias de flujo lateral de un dispositivo similar al de la Fig. 5. La trayectoria de flujo en este dispositivo contiene una serie de elementos retenidos por el alojamiento de plástico. El primer elemento en la trayectoria de flujo es una almohadilla absorbente 66 de material textil no tejido. Esta se sitúa en el extremo radialmente más interior de la trayectoria de flujo, y se coloca directamente debajo del canal de entrada 62 del dispositivo. La almohadilla absorbente 66 está en contacto capilar con la zona de reacción 68 de la trayectoria de flujo.

35 La zona de reacción 68 es una almohadilla porosa de fibra de vidrio de aproximadamente 1 mm de espesor, 1 cm de ancho, y 3 cm de largo (es decir, se extiende aproximadamente 3 cm radialmente hacia el exterior de la entrada 62). La almohadilla de fibra de vidrio incorpora unas perlas de soporte con peroxidasa de rábano (HRP) conjugada con las mismas mediante un engarce que contiene péptidos como se ha descrito anteriormente en el presente documento. El péptido tiene 10-15 residuos y contiene a la secuencia ala-ala-pro-val que es específica para la elastasa.

40 La conjugación de HRP con los péptidos unidos a sustrato puede lograrse por ejemplo a través del reactivo de entrecruzamiento bifuncional sulfo-CCPA. La reacción es un procedimiento en dos etapas, que incluye 1) formación de HRP-maleimida, seguido de 2) reacción con un péptido que se ha conjugado con la superficie del sustrato utilizando procedimientos convencionales.

45 Las condiciones típicas para la conjugación de HRP descritas por Mitchell C. Sanders *et al.* (*op. cit.*) son: (1) conjugación HRP-maleimida: se disuelven 2,5 mg de HRP de Roche en 500 µl de fosfato de Na 1M (pH de 7,4). Se disuelve Sulfo-SMCC en 50 µl de DMSO, y se combina con el HRP durante 20 minutos a temperatura ambiente. La

separación se consigue mediante filtración en gel en tampón de conjugación de maleimida; (2) Conjugación de HRP-Péptido-Membrana: las fracciones que están libres de sulfo-SMCC (~1 ml) se combinan con el péptido unido al sustrato y se hacen reaccionar a ~4°C durante toda la noche con rotación. Se llevan a cabo varios lavados, que incluyen dos lavados de 20 minutos con 100 ml de Tritón al 0,1% en PBS, seguido de dos lavados de 20 minutos con solución de PEG 5000 al 0,1%, y un lavado de 1 hora en 250 ml de una solución de sacarosa al 10%, seguido de aplicación de vacío rápido durante toda la noche.

A continuación se pipetea un alícuota que contenía 10 µl de una solución al 10% de las perlas conjugadas sobre la tira de fibra de vidrio para formar la zona de reacción.

El extremo radialmente más exterior de la almohadilla de la zona de reacción 68 está en contacto capilar con la tira de detección 70. La tira de detección 70 está formada por una membrana POREX de una longitud total de aproximadamente 4 cm, que tiene depositada sobre la misma una zona de detección 74 de 4-cloro-1-naftol que experimenta un cambio de color en presencia de HRP. La zona de detección 74 se hace depositando 0,5 µl de una solución de 40 mg/ml de 4-cloro-1-naftol en etanol sobre una zona de 1 cm de la tira de detección.

La tira de detección 70 se proporciona adicionalmente con una línea de control 72 de nitrocelulosa que reacciona con una cantidad umbral predeterminada de HRP libre para reducir la incidencia de resultados positivos falsos. Para formar la línea de control 72, se crea una solución de nitrocelulosa al 2% en metanol y se depositan 0,5 µl en una línea de 1 cm, a una distancia de 1 cm de la línea de ensayo.

Por último, el extremo radialmente hacia el exterior de la tira de detección 70 está en contacto capilar con el depósito absorbente 76, que actúa para drenar la muestra de líquido a través de la tira reactiva y capturar el líquido en el extremo de la tira. El depósito absorbente 76 es una tira de rayón/poliacrilato no tejido de una longitud de aproximadamente 3 cm que se ha impregnado con una solución de azul de tetrabromofenol al 1% en agua destilada y a continuación se ha secado. El indicador en el depósito absorbente 76 cambia de color cuando queda empapado en la solución de ensayo, y este cambio de color puede verse a través de la ventana 58 del alojamiento. El cambio de color puede utilizarse para confirmar que un volumen mínimo predeterminado de la muestra de líquido ha pasado a través de la zona de detección, reduciendo de ese modo la probabilidad de resultados negativos falsos.

En formas de realización alternativas, el hisopo puede sustituirse por un punzón de biopsia, opcionalmente con medios para macerar la muestra.

Durante el funcionamiento, el hisopo se utiliza para obtener una muestra de fluido de herida. Por lo general la muestra tendrá un volumen de aproximadamente 100 µl del fluido de herida. El hisopo se inserta en el orificio de recepción de la muestra del dispositivo por medio del "Luer-lock". A continuación, la muestra se expulsa del hisopo inyectando solución salina (PBS estéril) a través del canal central del hisopo desde la jeringa. La muestra pasa a través de los canales de entrada y a lo largo de las tiras reactivas. Después de un tiempo predeterminado, se mira la parte inferior del dispositivo para evaluar los resultados del análisis.

Las formas de realización anteriormente indicadas se han descrito sólo a modo de ejemplo. Muchas otras formas de realización que se encuentran dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas se pondrán de manifiesto para el experto en la materia.

## REIVINDICACIONES

1. Un aparato de ensayo para diagnóstico que comprende:

una varilla (1, 11, 32) que presenta un primer extremo y un segundo extremo;

un hisopo (2) o un punzón de biopsia (9, 44) montado en el primer extremo de la varilla; y

5 un capuchón (3, 4, 30) para su ajuste sobre el primer extremo de la varilla, comprendiendo dicho capuchón por lo menos un reactivo de ensayo para diagnóstico;

en el que la varilla (1, 11, 32) comprende por lo menos un elemento de enganche del capuchón (6, 42) que se extiende radialmente hacia el exterior del hisopo (2) o del punzón de biopsia (9, 44) para engancharse con el capuchón (3, 4, 30) para retener el capuchón en la varilla (1, 11, 32), **caracterizado porque** dicho elemento de enganche del capuchón se sitúa próximo al primer extremo a una distancia de la punta del hisopo o del punzón de biopsia de 1 mm a 30 mm en la dirección del segundo extremo, y en el que la varilla con el hisopo o el punzón de biopsia unido está esterilizada y dicho capuchón no está esterilizado.

15 2. Un aparato de ensayo para diagnóstico según la reivindicación 1, en el que el elemento de enganche del capuchón (6, 42) se selecciona del grupo que consiste en: una zona de sección decreciente de la varilla para formar un ajuste de interferencia con el capuchón, un saliente de ajuste a presión para formar un ajuste a presión con uno o más salientes complementarios en una superficie interior del capuchón, y un saliente roscado para formar un ajuste de tornillo con una o más roscas complementarias (46) en una superficie interior del capuchón.

20 3. Un aparato de ensayo para diagnóstico según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la varilla (1, 11, 32) es hueca, de manera que puede hacerse bajar un fluido por la varilla para expulsar una muestra biológica desde el hisopo (2) o el punzón de biopsia (9, 44).

4. Un aparato de ensayo para diagnóstico según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que los elementos de ajuste complementarios (6, 42) en el capuchón (3, 4, 30) y la varilla (1, 11, 32) se adaptan para proporcionar estanqueidad prácticamente total a los líquidos entre el capuchón y la varilla.

25 5. Un aparato de ensayo para diagnóstico según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que cuando el capuchón (3, 4, 30) se fija en la varilla (1, 11, 32), el hisopo o la biopsia está en contacto con un material absorbente (21) que puede drenar el fluido del hisopo o la biopsia hacia el uno o más reactivos de diagnóstico.

30 6. Un aparato de ensayo para diagnóstico según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que se une un hisopo (2) al primer extremo de la varilla (1) y se dimensiona el orificio de recepción de la muestra del capuchón (3) de tal manera que, cuando el capuchón (3) se fija en la varilla (1), el hisopo es comprimido por el capuchón de diagnóstico para exprimir el fluido del hisopo.

7. Un aparato de ensayo para diagnóstico según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que se une un punzón de biopsia (9, 44) al primer extremo de la varilla (11, 32) y el capuchón comprende adicionalmente un saliente interno (48) adaptado para aplastar o macerar una muestra de tejido en el punzón de biopsia cuando el punzón (9, 44) se fija en el capuchón.

35 8. Un aparato de ensayo para diagnóstico según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el capuchón (3, 4, 30) es por lo menos parcialmente transparente, o el capuchón (30) comprende una o más aberturas de ventana (56, 58) en el mismo, para permitir la observación visual de un indicador de diagnóstico dentro del capuchón.

40 9. Un aparato de ensayo para diagnóstico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el capuchón es un capuchón de diagnóstico (3, 4) que comprende un cuerpo que tiene básicamente forma de taza, un tapón absorbente (21) situado dentro del cuerpo, y por lo menos un reactivo de ensayo para diagnóstico situado dentro o alrededor del tapón absorbente.

45 10. Un aparato de ensayo para diagnóstico según la reivindicación 9, en el que el por lo menos un reactivo de ensayo para diagnóstico se proporciona dentro de o sobre una tira de diagnóstico anular (20) que se extiende radialmente alrededor del interior del capuchón.

11. Un aparato de ensayo para diagnóstico según la reivindicación 9, en el que el por lo menos un reactivo de ensayo para diagnóstico se proporciona dentro de o sobre una hoja de diagnóstico (15, 16, 17) que se extiende transversalmente por el interior del capuchón (3).

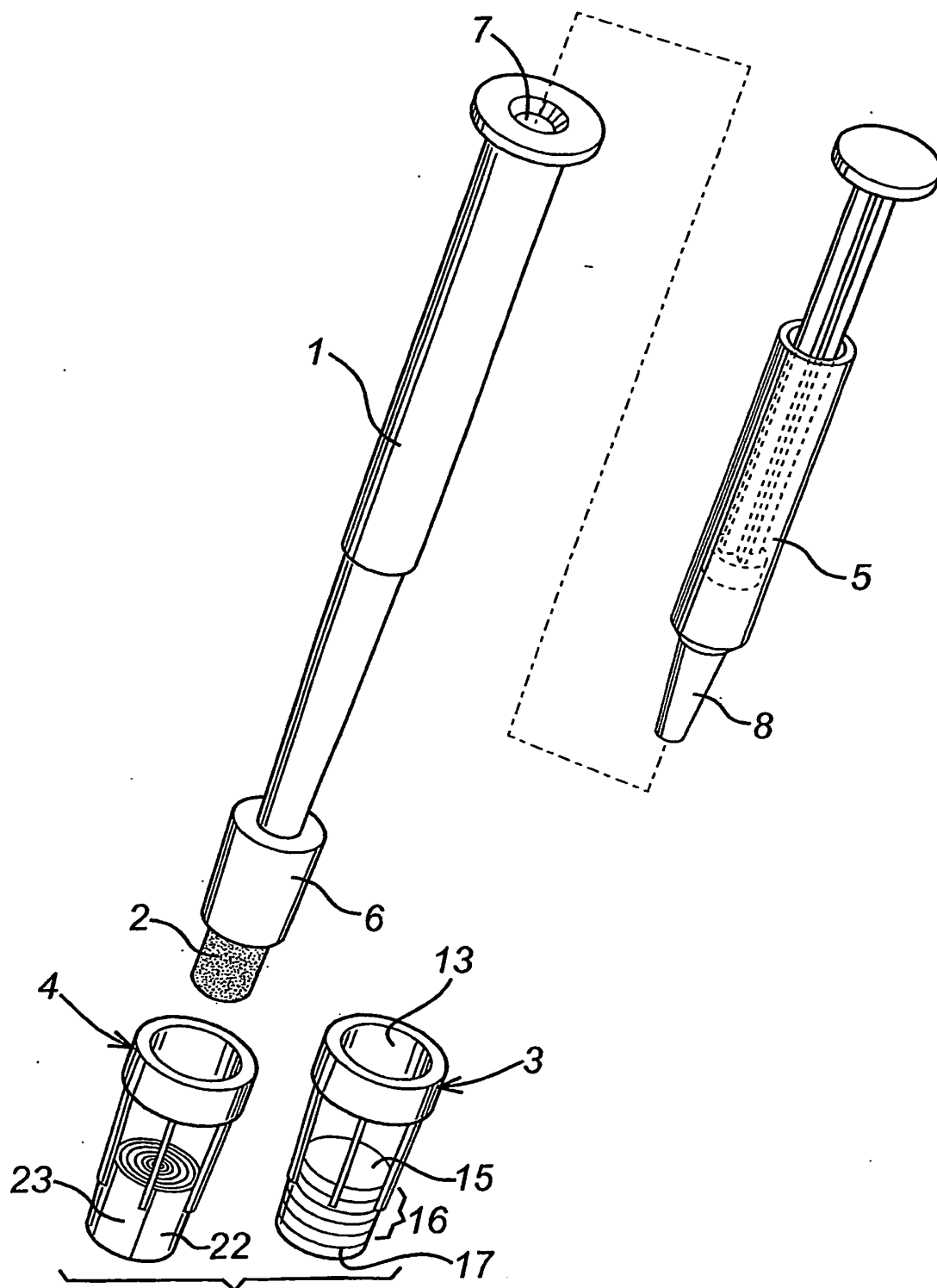
50 12. Un aparato de ensayo para diagnóstico según la reivindicación 9, en el que el tapón absorbente (21) tiene un volumen no comprimido desde aproximadamente 10 hasta aproximadamente 1.000 mm<sup>3</sup>, preferentemente desde aproximadamente 50 hasta aproximadamente 300 mm<sup>3</sup>.

13. Un aparato de ensayo para diagnóstico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el capuchón

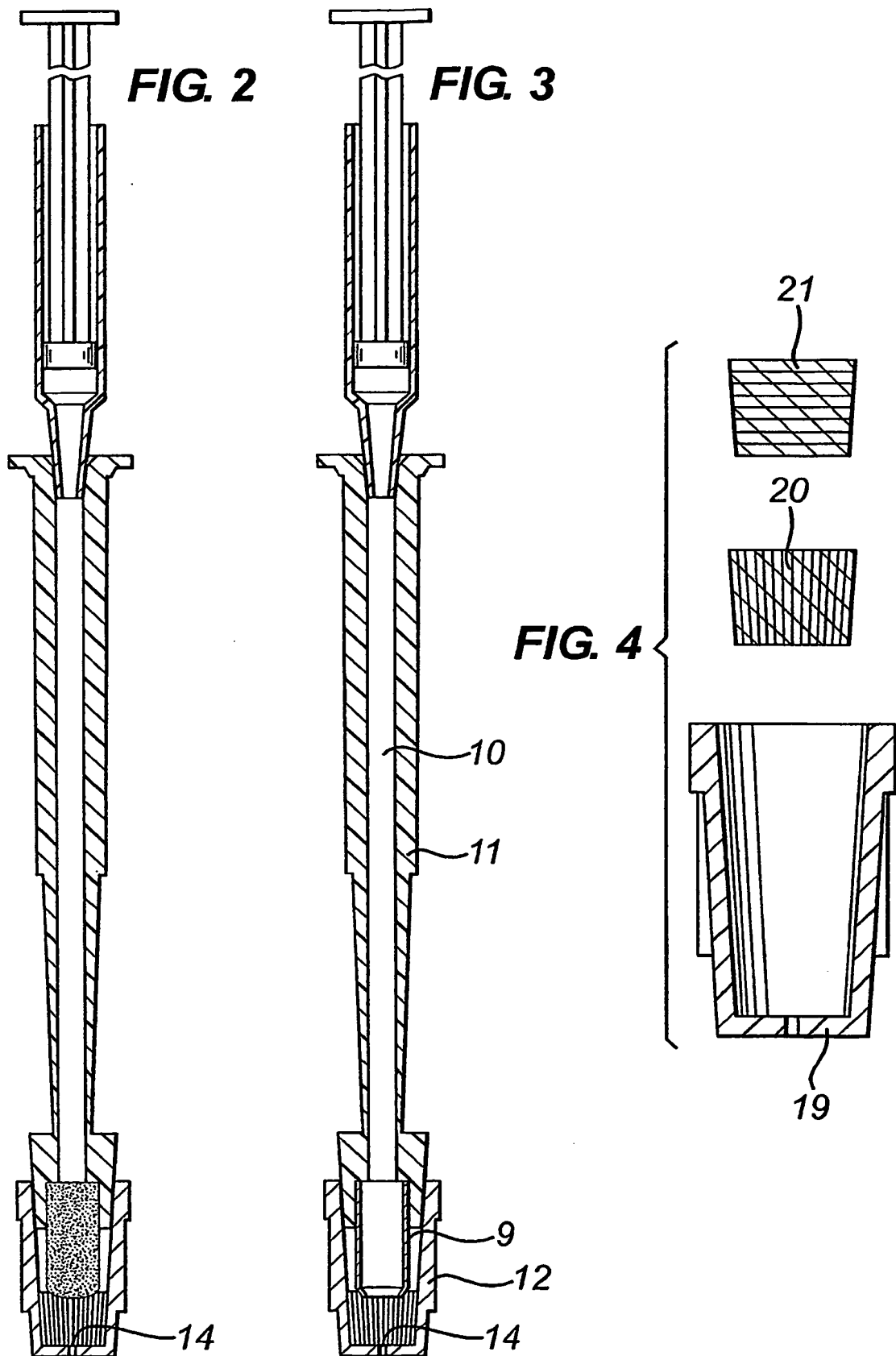
(30) comprende un orificio (38) de recepción de la muestra que presenta una superficie interior configurada para engancharse con el elemento (42) de enganche del capuchón en el eje, y un alojamiento que define una trayectoria de flujo lateral para una muestra de líquido, presentando la trayectoria de flujo lateral un extremo de entrada en comunicación fluida con el orificio (38) de recepción de la muestra.

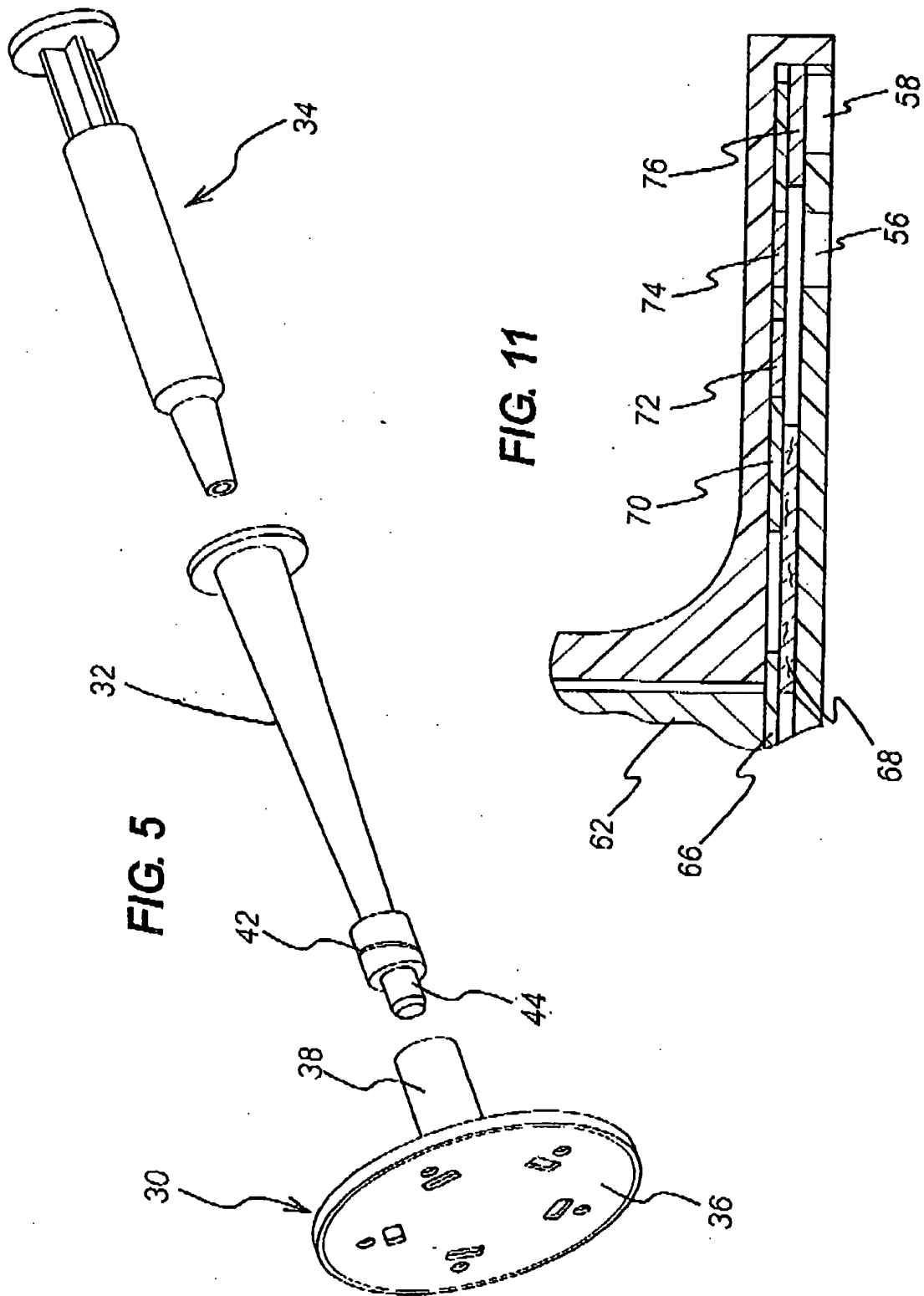
- 5 14. Un aparato de ensayo para diagnóstico según la reivindicación 13, en el que el alojamiento comprende adicionalmente una base para el capuchón (30), de manera que el capuchón pueda apoyarse sobre dicha base en una superficie horizontal abriéndose el orificio (38) de recepción de la muestra en una dirección ascendente para recibir la varilla.
- 10 15. Un aparato de ensayo para diagnóstico según la reivindicación 14, en el que el alojamiento tiene una superficie inferior prácticamente plana que forma dicha base para el alojamiento, y el orificio (38) de recepción de la muestra se abre hacia arriba desde una superficie superior del alojamiento frente a dicha superficie inferior plana.
16. Un aparato de ensayo para diagnóstico según la reivindicación 14 ó 15, en el que la trayectoria de flujo lateral se extiende básicamente en un plano que es prácticamente perpendicular al eje del orificio (38) de recepción de la muestra.
- 15 17. Un aparato de ensayo para diagnóstico según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16, en el que el alojamiento contiene una pluralidad de trayectorias de flujo lateral para detectar una pluralidad de analitos diferentes.
18. Un aparato de ensayo para diagnóstico según la reivindicación 17, en el que la pluralidad de trayectorias de flujo lateral se separa radialmente alrededor del orificio (38) de recepción de la muestra, preferentemente en un plano prácticamente perpendicular al eje del orificio (38) de recepción de la muestra.
- 20 19. Un aparato de ensayo para diagnóstico según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende una primera dicha varilla (1) que presenta un hisopo unido a la misma, y una segunda dicha varilla (11, 32) que presenta un punzón de biopsia unido a la misma, y en el que el capuchón de diagnóstico (3, 4, 30) puede fijarse de manera intercambiable en las dichas varillas primera y segunda.

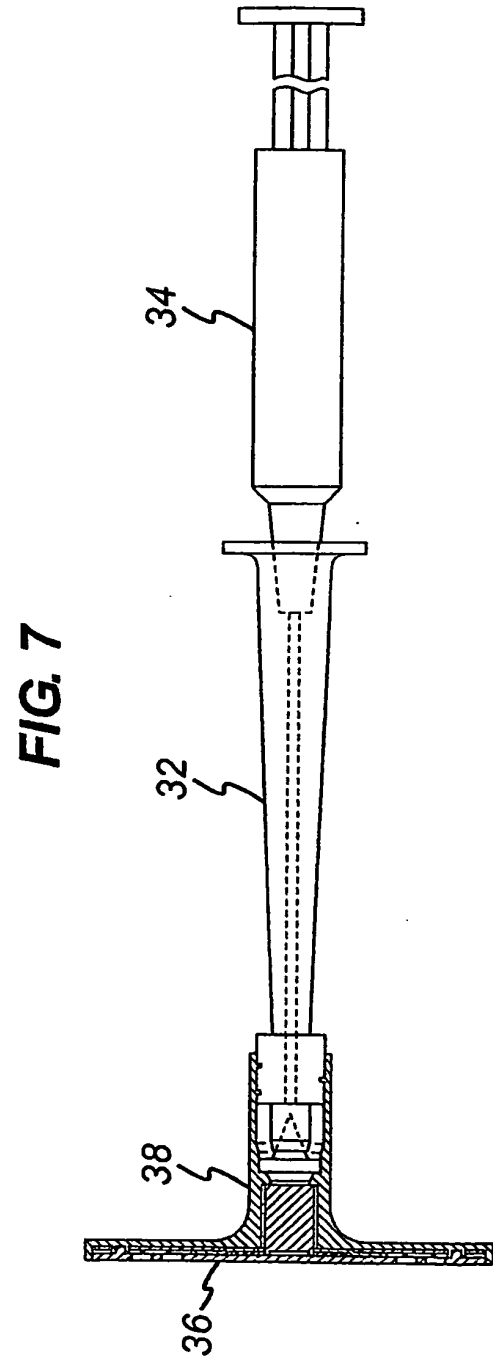
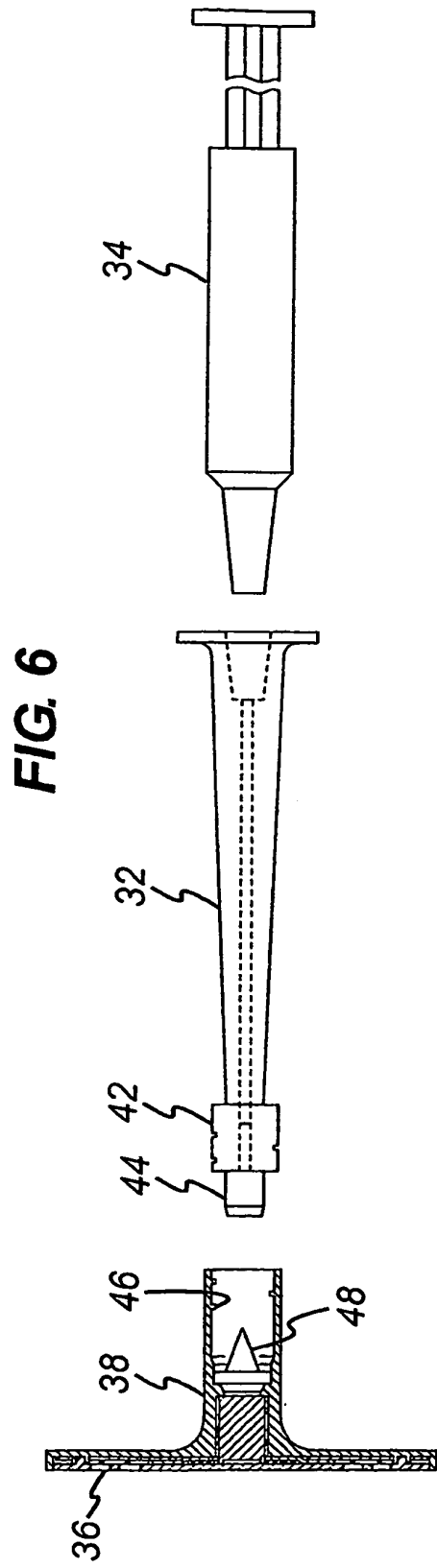
**FIG. 1**



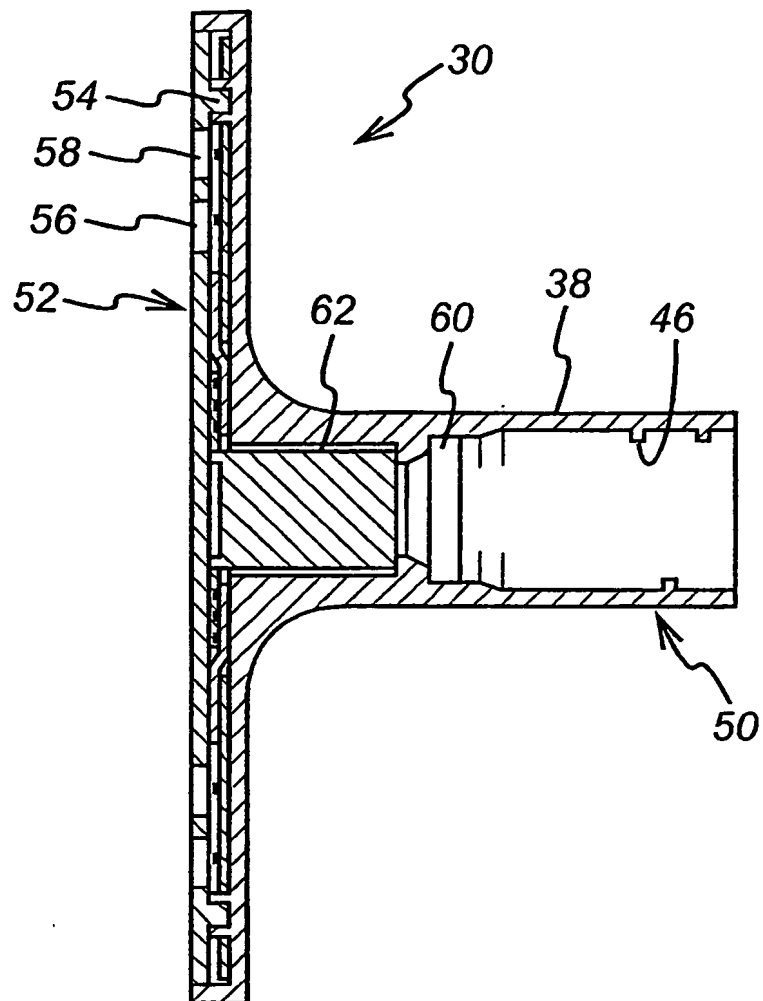




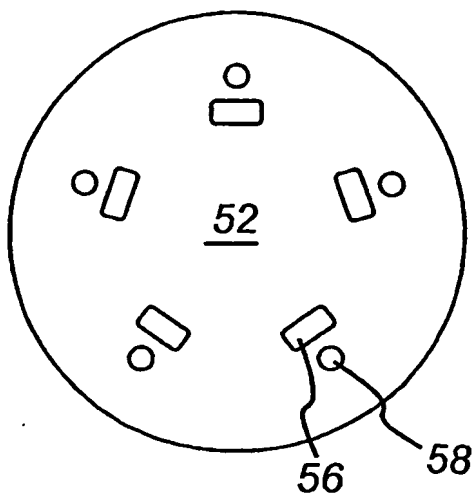




**FIG. 8**



**FIG. 9**



**FIG. 10**

